

PCT/JP 99/02442

12.05.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 02 JUL 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年12月24日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第366820号

出願人

Applicant(s):

積水化学工業株式会社

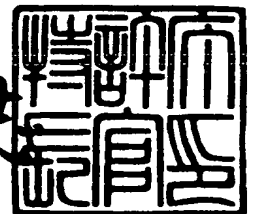
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3039394

【書類名】 特許願

【整理番号】 98P03691

【提出日】 平成10年12月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 免疫測定試薬および免疫測定法

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社
 内

 【氏名】 赤峰 隆之

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社
 内

 【氏名】 横井 正之

【特許出願人】

 【識別番号】 000002174

 【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

 【代表者】 西澤 進

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005083

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫測定試薬および免疫測定法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定試薬であって、

（a）上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体、

（b）上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素、および

（c）上記酵素の基質

からなる免疫測定試薬。

【請求項 2】 酵素阻害剤が、該酵素に対する抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定試薬。

【請求項 3】 酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 記載の免疫測定試薬。

【請求項 4】 不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されていることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の免疫測定試薬。

【請求項 5】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、請求項 1～4 のいずれかに記載の免疫測定試薬と、上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、不溶性担体を利用する免疫測定試薬および免疫測定法、特に、測定対象物質を高感度で測定可能な免疫測定試薬および免疫測定法に関する。

【0002】

【従来技術】

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用され

ている。これらの測定法の代表的方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

【0003】

免疫測定法としては、免疫比濁法（T I A法）、ラテックス比濁法（L I A法）、酵素免疫測定法（E I A法）、放射免疫測定法（R I A法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、T I A法やL I A法が使用されている。T I A法やL I A法では、測定する生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質（C R P）、抗ストレプトリジン-O抗体（A S O）、フィブリン分解産物（F D P）などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数n g / m L以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、E I A法やR I A法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、 α フェトプロテイン（A F P）に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数n g / m L以下の場合に用いられる。

【0004】

更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、E I A法やR I A法などが益々利用されてきている。しかしながら、E I A法やR I A法は、T I A法やL I A法が測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置（以下、汎用自動分析装置）へ適用可能であるのに比べて、反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や放射性同位元素の種類が種々あるため、特定の自動分析装置（以下、専用自動分析装置）へのみ適用される場合が多く、R I A法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種々の問題がある。

【0005】

近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できるような方法が要望

されている。超微量測定が可能な手法としては、L I A 法や E I A 法の変法または改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、L I A 法や E I A 法などでは従来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。

【0006】

測定法自体の精度を上げる手法としては、L I A 法の不溶性担体を着色する方法（特開平 1-214760 号公報）、E I A 法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法（特開平 5-34346 号公報）などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平 3-167475 号公報に提案される方法がある。

【0007】

しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、E I A 法や R I A 法に代表される微量成分の測定法は、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なるためであるが、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法は、B/F 分離と呼ばれる操作（B は反応により結合したもの、F は未反応のもの）が必ず必要であるため、B/F 分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B/F 分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

【0008】

最近、特開平 5-249112 号公報、特開平 7-179495 号公報などにみられるように、B/F 分離の不必要な測定法も提案、開発されつつあるが、感度不足、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置しか適用できないなどの問題がある。

【0009】

一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声大きい。

【0010】

以上のように、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザーの強い要望があるにもかかわらず、B/F分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

【0011】

また、臨床現場では一つの生体試料より複数の項目を測定することが多く、そのため一つの生体試料を繰り返し違う方法で測定することが多々あり、測定時間がその分長くかかったり、測定者が生体試料に触れる機会が多くなり感染の危険があるという問題があった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題点を解決するものであり、その目的は、①試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないか、またはB/F分離を簡便化して、簡便に分析測定できる免疫測定試薬および免疫測定法、②B/F分離を簡便化することにより、測定を簡便化し、一度に多項目測定可能な免疫測定試薬および免疫測定法、のうちの少なくとも一つを提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

以下、本明細書において、一文章中に、抗原（または抗体）という表現と、抗体（または抗原）という表現がある場合、括弧内は括弧内同士が対応し、括弧外は括弧外同士が対応しているものとする。

【0014】

本発明者らは、上記のような課題に鑑み、新規でかつ従来と同等もしくはそれ以上に感度が高く、かつ、汎用自動分析装置へ適用可能な免疫測定試薬および免疫測定法の開発のため、鋭意研究を重ねた結果、B/F分離の必要がないか、またはB/F分離を簡便化できる微量成分の新規分析試薬および新規分析法を完成するに至った。

【0015】

すなわち、請求項 1 記載の発明は、試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定試薬であって、

（a）上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体、

（b）上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素、および

（c）上記酵素の基質

からなる免疫測定試薬である。

【0016】

請求項 2 記載の発明は、酵素阻害剤が、該酵素に対する抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫測定試薬である。

請求項 3 記載の発明は、酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 記載の免疫測定試薬である。

請求項 4 記載の発明は、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されていることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の免疫測定試薬である。

【0017】

請求項 5 記載の発明は、試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、請求項 1～4 のいずれかに記載の免疫測定試薬と、上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法である。

【0018】

【作用】

以下、本発明の作用について詳細に述べる。

同一の不溶性担体上に、生体試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体を含む試薬を第 1 試薬、上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素を含む試薬を第 2 試薬、上記酵素の基質を含む試薬を第 3 試薬とする。この場合、第 1 試薬と上記測定対象物質が含まれている生体試料とを混合すると、生体試料中の抗原（または抗

体)と不溶性担体に担持された抗体(または抗原)との抗原抗体反応(第1反応)が起こり、不溶性担体の凝集が生じる。次に、第2試薬を添加すると、第2試薬中の酵素と不溶性担体に担持された酵素阻害剤との反応(第2反応)が起こるが、第2反応は生体試料中の抗原(または抗体)の量に依存するものである。酵素阻害剤は酵素と反応すると、酵素活性を失活または減少させるものであるが、生体試料中に抗原(または抗体)が含まれていない時は、第1反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、不溶性担体上の酵素阻害剤が酵素と反応して酵素を失活させるため、第3試薬を添加しても、酵素による吸光度変化を生じさせない。

【0019】

これに対して、生体試料中に抗原(または抗体)が含まれていると、その含有量に応じて、第1反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、凝集に関与している不溶性担体上の酵素阻害剤と酵素との反応は、凝集塊の立体障害のため起こりにくくなり、酵素が失活せず、第3試薬を添加した場合、基質と反応し吸光度変化を生ずる。

【0020】

このようにして、酵素阻害剤を不溶性担体に担持させることにより、第2反応も生体試料中の抗原(または抗体)の量に依存させることができるようになる。このように、本発明の免疫測定試薬および免疫測定法は、第1反応と第2反応が共に、生体試料中の抗原(または抗体)の量に依存した反応となる。

【0021】

また、不溶性担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されているものを用いると、反応が全て終わった後、反応容器下部から磁石で不溶性担体を吸い寄せることにより、溶液と不溶性担体を分離することができる。このようにすれば、不溶性担体の濁度上昇の影響なしに溶液の発色のみを測定することができる。また、例えば、反応試薬中に上記試薬1～3の組み合わせを2種類以上を混合させた場合、不溶性担体の凝集による濁度上昇の変化に影響されず、それぞれの酵素の発色のみを測定することができるので、2種類以上の抗原(または抗体)の測定を一度に行うことができる。

【0022】

なお、上記説明における試薬組成および試薬の種類は代表的な試薬の例であり、例えば、第1試薬と第2試薬は条件を整えることにより、一つの試薬にすることなども可能であり、上記に限定されるものではない。

【0023】

以上より、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離が不要か、または簡便で、しかも同時多項目測定可能な新規な免疫測定試薬および免疫測定法が得られる。

【0024】

【発明の実施の形態】

本発明により測定される測定対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型、C型）由来抗原または抗体；HIV抗原または抗体；梅毒由来抗原または抗体； α -フェトプロテインに代表される癌マーカー；インシュリンに代表されるホルモン；オータコイドなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

【0025】

本発明に使用される不溶性担体としては、例えば、有機高分子粉末、微生物、血球および細胞膜片等が挙げられる。有機高分子粉末としては、例えば、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉末；ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸（塩）共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、アクリロニトリル-ブタジエーン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などの合成高分子粉末などが挙げられる。特に、合成高分子粉末を均一に懸濁させたラテックスが好ましい。上記不溶性担体は、その使用目的・用途などにより異なるが、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基などを導入した不溶性担体も適宜使用可能である。上記ラテックスを用いる場合、そのラテックス粒子の粒径は、0.005～1.5 μm が好ましく、0.05～0.6 μm がより好ましい。

【0026】

請求項 4 記載の発明に使用される不溶性担体は、上記担体中に、磁性物質または可磁化物質が含有されているものであり、可磁化物質としては、例えば、酸化鉄が挙げられる。請求項 4 記載の発明に使用される不溶性担体の具体的な例としては、ペリタス社製、ダイナビーズが挙げられる。

【0027】

本発明に使用される酵素としては、基質と反応して吸光度変化を生じるものであれば特に限定されない。例えば、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。酵素には、天然物から得られたもの、遺伝子工学的手法により得られたものなどあるが、いずれも使用可能である。通常は、天然物から得られたものを使用すればよい。

【0028】

また、上記酵素を測定に使用する際は、適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。酵素の使用時の濃度としては、0.001~10 IU/mL が好ましいが、使用する酵素の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0029】

次に、本発明に使用される基質は、使用する酵素と反応して吸光度変化を生じるものが用いられる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合は基質として o -フェニレンジアミンやピロガロールおよびトリンダー試薬、酵素としてアルカリフォスファターゼを使用する場合は基質として p -ニトロフェニルリン酸、酵素として β -ガラクトシダーゼを使用する場合は基質として o -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドなどが挙げられるが、特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

【0030】

上記の基質は、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。測定に使用する際は適当な緩衝液などに溶解・希釈して用いる。

緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G o o d 緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。基質の使用時の濃度としては、0.1~1000 mMが好ましいが、使用する基質の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0031】

次に、本発明に使用される酵素阻害剤としては、使用する酵素と結合して酵素活性を失活させるものであれば、特に、限定されず、例えば、ペプチド、抗体、フッ素化合物、イオウ化合物など、使用する酵素によりそれに対応した酵素阻害剤を用いる。

酵素阻害剤として、酵素に対する抗体（以下、抗酵素抗体という）を用いる場合は、抗体種としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく、また、製造方法についても、公知の方法のいずれでもよい。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、山羊、めん羊などの動物に、使用する酵素を免疫して産生させればよい。モノクローナル抗体についても公知の方法を用いて得ることができる。

【0032】

このようにして得られた抗体については公知のクロマトグラフィーなどによって適宜精製してもよいし、場合によっては特別の精製をせずに用いてもよい。また、測定に使用する際は適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G o o d 緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。

【0033】

酵素阻害剤の使用時の濃度としては、0.01~10 mg/mLが好ましいが、使用する酵素阻害剤の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0034】

本発明で用いる、抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素阻害

剤とを担持させた不溶性担体 (a) を製造する方法について説明する。

不溶性担体への抗体 (または抗原) と酵素阻害剤の結合方法は、使用する抗体 (または抗原) 及び酵素阻害剤の種類により異なるが、通常、以下に示す方法で行う。抗体 (または抗原) を含む溶液と酵素阻害剤を含む溶液を同時に、または、順次、不溶性担体の懸濁液に添加し攪拌すると、物理的吸着により抗体 (または抗原) と酵素阻害剤が不溶性担体に結合する。

【0035】

また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されている不溶性担体については、適当な架橋剤を添加することにより、抗体 (または抗原) と酵素阻害剤を不溶性担体に結合させることができる。この場合、架橋剤で架橋できるように、抗体 (または抗原) と酵素阻害剤を修飾する必要がある。物理的に吸着させるか、架橋剤により結合させるかは、使用する抗体 (または抗原) と酵素阻害剤の物性や構造を考慮に入れ、適宜選択すればよい。

【0036】

上記結合反応時の pH は 3 ~ 10、温度は 2 ~ 50℃ が好ましい。pH がこの範囲をはずれると、抗体 (または抗原) がタンパク質であるため変性してしまうなどの問題がある。また、温度については、2℃ 未満であれば反応速度が遅く、所望の感度を有するものが得にくくなり、50℃ を超えると、抗体 (または抗原) が変性してしまうなどの問題がある。

【0037】

【実施例】

実施例 1

① 試薬および材料

ラテックス：10% (W/V) ポリスチレンラテックス (粒径 0.4 μm、積水化学工業社製)

ラテックス希釈用緩衝液：50 mM の第 1 リン酸ナトリウムと 50 mM の第 2 リン酸ナトリウムを pH 6.5 となるように混合したもの

C 型肝炎ウイルスコア抗原 (p22)：酵母菌で発現させた recombinant C 型肝炎ウイルスコア抗原 (オーストラル・バイオリジカルズ社製)

抗原希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液に同じ

抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体：腹水から硫酸沈殿によりイムノグロブリン分画にまで精製した抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体

抗体希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液に同じ

【0038】

酵素液（R3液）：西洋ワサビペルオキシダーゼ（257 U/mL、東洋紡社製）を上記ラテックス希釈用緩衝液にて0.3 U/mLに希釈したもの

基質液（R4液）：10 mM N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3,5-ジメトキシアニリン（同仁化学社製）8 μ L、4 mM 4-アミノアンチピリン（和光純薬社製）40 μ L、12 mM過酸化水素水（三徳化学社製）3 μ Lを混合して使用した。

ブロッキング用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液にウシ血清アルブミン（Fraction V、Miles Corp. 社製）を1%（W/V）になるように、また NaN_3 を0.1%（W/V）になるように添加したもの。

検体希釈用希釈液（R1液）：ブロッキング用緩衝液に、ポリエチレングリコール6000（平均分子量7500、和光純薬社製）を1%（W/V）になるように添加したもの。

C型肝炎ウイルス検体：C型肝炎ウイルス陽性患者血清（INTERGEN社製）

【0039】

②ラテックス試薬の調製

ポリスチレンラテックス1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3%（W/V）ラテックス液を得た。C型肝炎ウイルスコア抗原および抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体は、タンパク濃度が800 μ g/mLになるようにそれぞれ抗原または抗体希釈用緩衝液で希釈し、抗原液および抗体液とした。

【0040】

上記3.3%（W/V）ラテックス液300 μ Lを25℃のインキュベータ中

でマグネチックスターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗原液および抗体液それぞれ100 μ Lずつを素早く添加し、25℃にて1時間攪拌した。

次に、ブロッキング用緩衝液を0.5mL添加し、25℃にて続けて1時間攪拌した。次に、この混合液を15℃、18000rpmで20分間、遠心分離を行った。得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を2mL添加し、上記と同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を2mL添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬を得た。これを4℃で保存した。

【0041】

③C型肝炎ウイルス検体の測定方法

上記のラテックス試薬 (C型肝炎ウイルスコア抗原という抗原と、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体という酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体)、酵素液および基質液からなる本発明の免疫測定試薬を用い、生化学用自動分析装置7170型 (日立製作所社製) を用いて以下のようにして、C型肝炎ウイルス検体の測定を行った。

上記②で得られた固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬をそのままR2液とした。測定条件は以下の通りである。

検体容量	20 μ L
検体希釈用希釈液 (R1液)	180 μ L
ラテックス試薬 (R2液)	20 μ L
酵素液 (R3液)	20 μ L
基質液 (R4液)	20 μ L
測定波長	600nm
測定温度	37℃

【0042】

試薬の投入順序は、上記自動分析装置のセルに入れた検体にR1液を投入し、1分後にR2液、その4分後にR3液、その5分後にR4液を投入する。基質液 (R4液) を添加してから、約75秒後の吸光度と約730秒後の吸光度の吸光

度の差 (ΔOD_{600nm}) を測定し、この吸光度の差を 10000 倍したものを吸光度変化量とした。

【0043】

④測定結果

C型肝炎ウイルス陽性患者血清 5 検体（それぞれ検体名称を検体イ，ロ，ハ，ニ，ホとする）を検体とし、2 段階希釈によって 2^{10} 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記③の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、カットオフ値（吸光度変化量の 40）以上のものを＋、カットオフ値未満のものを－とした。これらの測定結果を表 1 に示した。

【0044】

比較例 1

①試薬および材料

実施例 1 の「①試薬および材料」と同様である。

【0045】

②ラテックス試薬の調製

実施例 1 の「②ラテックス試薬の調製」においては、ポリスチレンラテックスに、C型肝炎ウイルスコア抗原および抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体を担持させたが、比較例 1 では抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体を使用しなかったことの他は、実施例 1 の「②ラテックス試薬の調製」と同様に操作し、C型肝炎ウイルスコア抗原のみが担持されたラテックス試薬を調製した。

【0046】

③C型肝炎ウイルス検体の測定方法

上記のラテックス試薬を用い、生化学用自動分析装置 7170 型（日立製作所社製）を用いて以下のようにして、C型肝炎ウイルス検体の測定を行った。

上記②で得られた固形分 0.25% (W/V) のラテックス試薬をそのまま R2 液とした。測定条件は以下の通りである。

検体容量	20 μ L
検体希釈用希釈液 (R1 液)	210 μ L

ラテックス試薬 (R 2 液) 30 μ L

測定波長 700 nm

測定温度 37℃

【0047】

試薬の投入順序は、上記自動分析装置のセルに入れた検体に R 1 液を投入し、5 分後に R 2 液を投入する。ラテックス試薬 (R 2 液) を添加してから、約 55 秒後の吸光度と約 300 秒後の吸光度の吸光度の差 ($\Delta OD 700 nm$) を測定し、この吸光度の差を 10000 倍したものを吸光度変化量とした。

【0048】

④測定結果

実施例 1 で用いたものと同様の C 型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、2 段階希釈によって 2^{10} 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記③の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、カットオフ値 (吸光度変化量の 80) 以上のものを +、カットオフ値未満のものを - とした。これらの測定結果を表 1 に示した。

【0049】

比較例 2

①試薬および測定方法

C 型肝炎ウイルス抗体測定用 E I A キットとして、市販の E I A キット (H C V · E I A II、ダイナボット社製) を用い、検体中の抗体量をキット添付の操作法に従って測定した。

【0050】

②測定結果

実施例 1 で用いたものと同様の C 型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、2 段階希釈によって 2^{10} 倍まで希釈したサンプルを用意した。上記②の測定方法に従って、各サンプルの吸光度を測定し、カットオフ値 (キットに付属の陽性、陰性コントロールの吸光度から算出) 以上のものを +、カットオフ値未満のものを - とした。これらの測定結果を表 1 に示した。

【0051】

【表 1】

			希 釈 倍 率						
			2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ¹⁰
検 体	イ	実施例 1	+	+	+	+	+	+	-
		比較例 1	+	+	+	+	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	+	-
	ロ	実施例 1	+	+	+	+	+	-	-
		比較例 1	+	+	+	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	+	-
	ハ	実施例 1	+	+	+	+	-	-	-
		比較例 1	+	-	-	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	-	-	-
	ニ	実施例 1	+	+	+	+	+	+	-
		比較例 1	+	+	+	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	-	-
	ホ	実施例 1	+	+	+	+	+	-	-
		比較例 1	+	+	-	-	-	-	-
		比較例 2	+	+	+	+	+	-	-

【0052】

表 1 から明らかなように、本発明の免疫測定試薬による測定結果（実施例 1）は、市販の E I A 法による測定結果（比較例 2）と同等であったが、従来のラテックス試薬による測定結果（比較例 1）とは、低濃度域および高濃度域のいずれにおいても一致しなかった。

【0053】

実施例 2

①試薬および材料

以下に示すもの以外は、実施例 1 の「①試薬および材料」に同じ。

可磁化物質含有ラテックス：可磁化物質（ Fe_2O_3 ）含有、10%（W/V）
ポリスチレンラテックス（粒径 0.4 μm 、ベリタス社製）

抗ヒトHBs抗体：山羊の抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製した山羊抗ヒトHBs抗体

抗ヒトCRP抗体：山羊の抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製した山羊抗ヒトCRP抗体

抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体：腹水から硫酸沈殿によりイムノグロブリン分画にまで精製した抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体

【0054】

酵素液（R3液）：西洋ワサビペルオキシダーゼ（257 U/mL、東洋紡社製）を前記ラテックス希釈用緩衝液にて0.3 U/mLに希釈したものと、 β ガラクトシダーゼ（500 U/mL、東洋紡社製）を前記ラテックス希釈用緩衝液にて0.3 U/mLに希釈したものとを1：1で混合したもの

基質液（R4液）：10 mM N-エチル-N-（2-ヒドロキシー-3-スルホプロピル）-3, 5-ジメトキシアニリン（同仁化学社製）8 μ L、4 mM 4-アミノアンチピリン（和光純薬社製）40 μ L、12 mM過酸化水素水（三徳化学社製）3 μ Lを混合した溶液に、o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド（ONPG）を1%（W/V）濃度となるように混合したもの

HBs標準品：ヒトプール血清から精製されたHBs標準品（1000 I. U./mL、1.7 μ g/mL）を生理食塩水にて400、200、100、50、10 I. U./mLにそれぞれ希釈して使用した。また、HBs標準品を含まない生理食塩水のみのもを0 I. U./mLとして用いた。

CRP標準品：ヒトプール血清から精製されたCRP標準品（デンカ生研社製）40、20、10、5、1 mg/dLを使用した。また、CRP標準品を含まない生理食塩水のみのもを0 mg/dLとして用いた。

反応停止液：リン酸一ナトリウム100 mM水溶液

【0055】

②ラテックス試薬の調製

可磁化物質含有ポリスチレンラテックス1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3%（W/V）ラテックス液を得た。抗ヒトHBs抗体、抗ヒトCRP抗体、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体および抗 β ガラ

クトシダーゼモノクローナル抗体は、タンパク濃度が $1600\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにそれぞれ抗体希釈用緩衝液で希釈し抗体液とした。

【0056】

上記3. 3% (W/V) ラテックス液 $300\mu\text{L}$ を 25°C のインキュベータ中でマグネチックスターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗体液それぞれ $100\mu\text{L}$ ずつを素早く添加し、 25°C にて1時間攪拌した。

次に、ブロッキング用緩衝液を 0.5mL 添加し、 25°C にて続けて1時間攪拌した。次に、この混合液を 15°C 、 18000rpm で20分間、遠心分離を行った。得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を 2mL 添加し、上記と同様に遠心分離することにより、沈殿を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈殿にブロッキング用緩衝液を 2mL 添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固形分 0.25% (W/V) のラテックス試薬を得た。これを 4°C で保存した。

【0057】

③ヒトHBs、ヒトCRP検体の測定方法

上記のラテックス試薬（抗ヒトHBs抗体および抗ヒトCRP抗体という抗体と、抗西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体および抗 β ガラクトシダーゼモノクローナル抗体という酵素阻害剤とを担持させた不溶性担体）、酵素液および基質液からなる本発明の免疫測定試薬を用い、分光光度計装置U-3200型（日立製作所社製）を用いて以下のようにして、ヒトHBs、ヒトCRP検体の測定を行った。

上記②で得られた固形分 0.25% (W/V) のラテックス試薬をそのままR2液とした。測定条件は以下の通りである。

1 検体当たりの試薬投入量

検体容量	1mL
検体希釈用希釈液 (R1液)	1.8mL
ラテックス試薬 (R2液)	0.2mL
酵素液 (R3液)	0.2mL
基質液 (R4液)	0.2mL

反応停止液	2 mL
測定波長	600 nmおよび420 nm
測定温度	37℃

【0058】

試薬の投入順序は、検体容器に入れた検体にR1液を投入し、3分後にR2液、その10分後にR3液、その10分後にR4液、その10分後に反応停止液を投入する。反応停止液を投入してから、検体容器下部から磁石を用いて可磁化物質含有ラテックス粒子を吸い寄せ、検体容器下部に沈殿させる。しかる後、上清の吸光度を600 nmおよび420 nmで測定した。

得られた測定値について、吸光度600 nmのものについては、検体として以下に示すHBs標準品を含む標準品検体を用いて得られた値から、検体として生理食塩水のみを用いて得られた値を差し引いて吸光度変化量とした。

得られた測定値について、吸光度420 nmのものについては、検体として以下に示すCRP標準品を含む標準品検体を用いて得られた値から、検体として生理食塩水のみを用いて得られた値を差し引いて吸光度変化量とした。

【0059】

④測定結果

試薬および材料の項に示したHBs標準品およびCRP標準品を用いて、HBs標準品およびCRP標準品の両方を含む以下の標準品検体を調製した。

HBs標準品を0 I. U. /mL、かつ、CRP標準品を0 mg/dL含むもの（すなわち、生理食塩水のみもの）；HBs標準品を10 I. U. /mL、かつ、CRP標準品を1 mg/dL含むもの；HBs標準品を50 I. U. /mL、かつ、CRP標準品を5 mg/dL含むもの；HBs標準品を100 I. U. /mL、かつ、CRP標準品を10 mg/dL含むもの；HBs標準品を200 I. U. /mL、かつ、CRP標準品を20 mg/dL含むもの。

HBs標準品およびCRP標準品の両方を含む標準品検体を検体として、上記③に従って、各濃度のそれぞれの標準品検体の吸光度変化量を測定した。得られた吸光度変化量（600 nm）とHBs標準品濃度（I. U. /mL）との関係、および、吸光度変化量（420 nm）とCRP標準品濃度（mg/dL）との

関係を表2に示した。

【0060】

【表2】

HBs標準品濃度(IU/mL)	10	50	100	200
吸光度変化(600nm)	0.118	0.601	1.211	2.434
CRP標準品濃度(mg/dL)	1	5	10	20
吸光度変化(420nm)	0.101	0.214	1.041	2.112

【0061】

表2の結果より検量線を作成した(図示はせず)。

次いで、3種類の血清検体(検体名称としてA、B、Cとする)を用いて、上記③に従って、それぞれの血清検体の吸光度変化量を測定した。得られた吸光度変化量を上記の検量線にあてはめて、血清検体中のHBs濃度およびCRP濃度を求め、結果を表3に示した。

【0062】

【表3】

検体	HBs濃度(IU/mL)	CRP濃度(mg/dL)
A	24	1.2
B	58	2.3
C	133	4.1

【0063】

この結果から、本実施例による測定試薬および測定方法は、汎用性が高く、簡便に同時多項目測定が可能なものであることが確認できた。

【0064】

【発明の効果】

請求項1～3記載の免疫測定試薬は、上述の通りであり、本発明の免疫測定試薬を用いると、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないので、簡便に測定できる。

請求項4記載の免疫測定試薬は、上述の通りであり、本発明の免疫測定試薬を用いると、B/F分離が簡便化されているので測定が簡便化されると共に、試料

中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できる。また、抗体（または抗原）、酵素阻害剤、酵素および酵素基質としてそれぞれ少なくとも2種類以上を組み合わせて用いれば、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く、一度に多項目同時測定できる。

本発明の免疫測定法は、上記の通りであり、本発明の免疫測定試薬を用いるので、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、簡便に測定できる。また、抗体（または抗原）、酵素阻害剤、酵素および酵素基質としてそれぞれ少なくとも2種類以上を組み合わせて用いれば、一度に多項目同時測定できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ①試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないか、またはB/F分離を簡便化して、簡便に分析測定できる免疫測定試薬および免疫測定法、②B/F分離を簡便化することにより、測定を簡便化し、一度に多項目測定可能な免疫測定試薬および免疫測定法、のうちの少なくとも一つを提供する。

【解決手段】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定試薬であって、

- (a) 上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素阻害剤（例、下記酵素に対する抗体）とを担持させた不溶性担体、
- (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素、および
- (c) 上記酵素の基質からなる免疫測定試薬。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002174]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
氏 名	積水化学工業株式会社